

黑鲷(*Sebastes schlegeli*)遗传多样性的等位酶研究*

刘丽娟^{1,2} 任利华¹ 姜向阳¹ 宋秀凯¹ 刘爱英¹
杜荣斌³ 张 静^{1,4} 姜海滨^{1①}

(1. 山东省海洋水产研究所 烟台 264006; 2. 山东师范大学生命科学学院 济南 250014;
3. 烟台大学海洋学院 烟台 264005; 4. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

提要 应用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)技术,对分别取自青岛、日照、荣成、长岛的野生黑鲷及荣成黑鲷人工繁育的 F_1 代共 5 个群体的等位酶多态性进行分析。结果表明,分析的 5 个群体 13 种等位酶的 25 个基因座位中,多态位点比例(P)为 36.0%—20.8%,平均每个位点的预期杂合度(H_e)为 0.076—0.036,平均每个位点的实际杂合度(H_o)为 0.063—0.040,证明所选 5 个群体具有较高的遗传多态性。5 个群体之间遗传距离(D)为 0.024—0.001,根据遗传距离进行 UPGMA 聚类分析,5 个群体聚类次序与亲缘关系和地理位置表现出明显的正相关关系,长岛群体与其它四个群体间遗传距离最大(0.024—0.020),达到居群间差异水平。

关键词 等位酶,黑鲷,遗传多样性

中图分类号 Q953

黑鲷(*Sebastes schlegeli* Higendorf 1880)属鲷形目、鲷科、平鲷属,分布于西太平洋中部和北部,在东海和黄海、朝鲜半岛、日本、鄂霍次克海南部均有分布(金鑫波,2006)。黑鲷肉质细嫩,味道鲜美,一直是我国北方海域重要的海捕经济鱼类。黑鲷由于具有抗病力强、生长速度快、耐低温、在北方海域可以自然越冬等特点,已成为我国北方重要的海水网箱养殖鱼类之一。而且黑鲷是近海礁栖性鱼类,营半定居式生活,人工增殖放流回捕率高,近年来逐渐成为我国增殖放流的重要海水鱼类。目前养殖黑鲷苗种以海捕野生苗为主要来源,养殖成活率较低,长期的过度捕捞也使黑鲷资源和遗传多样性遭到破坏,因此大量人工繁育速生、抗病优质黑鲷苗种已成为保护我国黑鲷资源、促进黑鲷养殖业可持续发展的必要手段。

本实验通过对青岛、日照、荣成、长岛野生群体和荣成群体人工繁育 F_1 代(牟平泰华海珍品养殖有限公司提供)群体的黑鲷等位酶研究,分析野生黑鲷的

遗传多样性水平,并对人工繁育群体的遗传变异水平进行评估(丁少雄等,2001),以期对其资源的科学管理和人工选育优良苗种提供理论依据。

1 材料与方法

黑鲷(*Sebastes schlegeli*)样品于 2007 年 4 月—2008 年 3 月分别取自青岛、日照、荣成、长岛和烟台泰华海珍品养殖有限公司(表 1),每个群体取 30 尾,活体运回实验室经形态学测量后解剖,分别取背部白肌和肝脏组织,编号后立即放置于 -80°C 超低温冰箱保存备用。

样品制备、染色参照王中仁(1996)的方法,垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)法参考 Gennady (2003)及何忠效等(1999),酶谱分析参照熊全沫(1992a, b)及王中仁(1996)的方法。

数据处理采用 Nei(1978)的方法,计算公式如下:

(1) 多态位点比例(P) = 多态位点数/所测位点

* 山东省科技厅良种工程项目“优质抗病速生鱼类(黑鲷)良种选育”课题资助,2005—2008。刘丽娟,硕士研究生,助理研究员, E-mail: liu_li_juan_426@yahoo.com.cn

① 通讯作者: 姜海滨, 研究员, E-mail: haibinjiang326@163.com

收稿日期: 2008-03-30, 收修改稿日期: 2008-05-21

表 1 黑鲷取样地点、时间和平均全长(cm)
Tab.1 The population, sample location and date, and the average length (cm) of *S. schlegeli* collected

居群	代码	取样地点	时间(年.月.日)	平均全长±标准差
长岛	CD	38°22'23" N—120°54'59" E	2008.03.23	31.57±2.65
荣成	RC	37°03'16" N—122°50'59" E	2007.05.10	18.13±1.38
青岛	QD	36°04'01" N—120°46'04" E	2007.12.06	22.30±2.11
日照	RZ	35°19'52"N—119°41'52" E	2007.10.20	21.45±1.93
荣成 F ₁ 代	TH	烟台泰华海珍品养殖有限公司	2007.04.27	15.54±1.01

总数;

(2) 平均每个位点的预期杂合度

$$(H_e) = \frac{\sum_{i=1}^n \left(1 - \sum_{j=1}^{m_i} q_{ij}^2 \right)}{n}$$

式中, n 为所测位点总数, q_{ij} 为第 i 个位点上第 j 个等位基因的纯合基因型的频率, m_i 为第 i 个位点上测定的等位基因的总数。

(3) 平均每个位点的实际杂合度

$$(H_o) = \frac{\sum_{i=1}^n \left(1 - \sum_{j=1}^{m_i} q_{ij} \right)}{n}$$

式中, n 为所测位点总数, q_{ij} 为第 i 个位点上第 j 个等位基因的纯合基因型的频率, m_i 为第 i 个位点上测定的纯合基因型的种类数。

(4) 遗传相似系数 I 和遗传距离 D

$$I = \frac{\sum_k \sum_i X_i Y_i}{\sqrt{\sum_k \sum_i X_i^2 \sum_k \sum_i Y_i^2}}$$

式中, X_i 为群体 X 中位点 k 第 i 个等位基因的频率, Y_i 为群体 Y 位点 k 第 i 个等位基因的频率, k 为指定的一个基因位点, i 为指定位点 k 上的等位基因。

$$D = -\ln I$$

2 结果

在青岛(QD)、日照(RZ)、荣成(RC)、长岛(CD)四个野生群体黑鲷和以荣成野生黑鲷为亲鱼人工育苗的 F₁ 代(TH)黑鲷 5 个群体中共检测了 20 种等位酶, 选择其中条带清晰、重复性良好的 13 种酶进行统计分析(表 2)。

通过对 13 种等位酶的酶谱统计分析, 得到 25 个位点, 其中长岛(CD)群体 24 个位点。5 个群体每个位点等位基因频率见表 3。

5 个群体黑鲷的预期杂合度 H_e 和实际杂合度 H_o 成对数据的 t 检验分析显示, $|t| = 0.744 < t_{4, 0.05(\text{双侧})} = 2.776$, 表明 5 个群体黑鲷的预期杂合度和实际杂合度均无显著差异, 黑鲷各群体内的近亲繁殖现象不明显(Rice, 1989)。

根据每个检测位点的基因频率, 获得的 5 个群体

表 2 黑鲷的 13 种等位酶来源组织及位点数
Tab.2 The enzymes and the number of loci from tissues of *S. schlegeli*

酶名称	简写	国际编号	亚基结构	组织	记录位点数
天冬氨酸转氨酶	AAT	EC 2.6.1.1	二聚体	肝脏	1
乙醇脱氢酶	ADH	EC 1.1.1.1	二聚体	肝脏	1
酯酶	EST	EC 3.1.1.1	单或二聚体	肝脏	4
甲酸脱氢酶	FDH	EC 1.2.1.2	二聚体	肌肉	1
异柠檬酸脱氢酶 I	IDH	EC 1.1.1.42	二聚体	肌肉	1
半乳糖脱氢酶	GAD	EC 1.1.1.48	未知	肌肉	1
葡萄糖脱氢酶	GDH	EC 1.1.1.118	二聚体	肌肉	1
谷氨酸脱氢酶	GDH	EC 1.4.1.2	二聚体	肝脏	1
6-磷酸葡萄糖脱氢酶	G6PD	EC 1.1.1.44	二聚体	肝脏	6
乳酸脱氢酶	LDH	EC 1.1.1.27	四聚体	肌肉	1
苹果酸脱氢酶	MDH	EC 1.1.1.37	二聚体	肌肉	3
苹果酸酶	ME	EC 1.1.1.40	四聚体	肌肉	2
次黄嘌呤脱氢酶	XDH	EC 1.1.1.204	二聚体	肝脏	2
合计	13				25

表 3 5 个群体黑鲷等位基因频率、多态位点比例(P)、平均每个位点等位基因有效数目(A_e)、预期杂合度(H_e)、实际杂合度(H_o)

Tab.3 The allele frequency, P , A_e , H_e , and H_o of the five *S. schlegeli* populations

位点名称	等位基因	基因频率				
		青岛(QD)	日照(RZ)	荣成(RC)	长岛(CD)	泰华(TH)
<i>aat</i> -1	a	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>adh</i> -1	a	0.083	0.083	0.017	0.000	0.000
	b	0.917	0.917	0.983	1.000	1.000
<i>est</i> -1	a	0.067	0.033	0.067	0.000	0.033
	b	0.933	0.967	0.933	1.000	0.967
<i>est</i> -2	a	0.383	0.333	0.417	0.300	0.333
	b	0.617	0.667	0.583	0.700	0.667
<i>est</i> -3	a	1.000	1.000	1.000	0.967	1.000
	b	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000
<i>est</i> -4	a	0.933	1.000	0.967	1.000	0.967
	b	0.067	0.000	0.033	0.000	0.033
<i>fdh</i> -1	a	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>gdh</i> -1	a	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>gad</i> -1	a	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>ldh</i> -1	a	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>gdh</i> -1	a	0.150	0.083	0.017	0.000	0.000
	b	0.850	0.917	0.983	1.000	1.000
<i>xdh</i> -1	a	0.017	0.017	0.000	0.000	0.000
	b	0.900	0.983	1.000	1.000	1.000
	c	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>xdh</i> -2	a	0.067	0.083	0.000	0.000	0.000
	b	0.933	0.917	1.000	0.000	1.000
<i>idh</i> -1	a	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>mdh</i> -1	a	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>mdh</i> -2	a	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000
	b	1.000	1.000	0.933	1.000	1.000
	c	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000
<i>mdh</i> -3	a	0.000	0.000	0.033	0.000	0.017
	b	1.000	1.000	0.967	1.000	0.983
<i>me</i> -1	a	0.000	0.083	0.000	0.000	0.000
	b	1.000	0.917	1.000	1.000	1.000
<i>me</i> -2	a	1.000	1.000	0.983	1.000	0.983
	b	0.000	0.000	0.017	0.000	0.017
<i>g6pd</i> -1	a	0.000	0.000	0.000	0.067	0.017
	b	1.000	1.000	1.000	0.933	0.967
	c	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017
<i>g6pd</i> -2	a	0.017	0.033	0.000	0.033	0.000
	b	0.883	0.833	1.000	0.883	1.000
	cc	0.100	0.133	0.000	0.083	0.000
<i>g6pd</i> -3	a	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>g6pd</i> -4	a	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>g6pd</i> -5	a	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>g6pd</i> -6	a	0.850	0.917	0.767	0.867	0.883
	b	0.150	0.083	0.233	0.133	0.117
多态位点比例 P		0.360	0.360	0.360	0.208	0.240
平均每个位点等位基因数 A		1.440	1.400	1.360	1.250	1.280
平均每个位点有效等位基因数 A_e		1.107	1.088	1.081	1.063	1.053
预期杂合度 H_e		0.076	0.064	0.053	0.044	0.036
实际杂合度 H_o		0.063	0.061	0.055	0.043	0.040

黑鲷之间的遗传一致度和遗传距离见表 4。

从表 3 可见, 青岛群体和日照群体、荣成群体和荣成 F_1 代的遗传一致度高达 0.999, 证明这两对群体各自之间有很强的基因交流(Rousset, 1997)。本实验所测 5 个群体间的遗传距离为 0.001—0.024, 其中长岛群体和青岛、日照、荣成、荣成 F_1 代之间的遗传距离均在 0.020—0.024 之间。根据 Nei(1975)的研究成果, 种群间遗传距离范围是 0—0.05, 亚种间是 0.02—0.2。Nei(1978)提出地方居群间遗传距离约为 0.01, 亚种间约为 0.1, 种间约为 1。长岛群体和其它 4 个群体之间应属不同地理居群的差别。根据遗传距离, 用 Mega4.0 软件进行 UPGMA (Unweighted pair group method of analysis)聚类分析(图 1)。

3 讨论

等位酶电泳技术是在遗传学研究中应用比较广

泛的遗传标记技术。通过对等位酶电泳谱带的分析, 可以识别出控制这些谱带表达的基因座位或等位基因, 从而比较客观地在基因水平上度量生物遗传变异的情况。多态位点比例和杂合度是评价种群遗传多样性的重要指标。

本文中所检测 5 个群体黑鲷 13 种等位酶的 25 个基因位点中, 15 个位点出现多态, 多态位点比例 36%—20.8%, 实际杂合度为 0.063—0.040。目前已检测出海水鱼的多态位点比例为 41.0%—12.5%(高悦勉等, 2004), 一般硬骨鱼类的实际杂合度为 0.051 ± 0.034 (梁君荣等, 2003), 与目前已检测出的海水鱼和一般硬骨鱼相比, 黑鲷遗传多样性处于中等偏高的水平, 说明黑鲷群体保持着较丰富的遗传变异水平。这可能是由于取样海域的野生黑鲷资源丰富, 同时, 作为一种刚刚兴起的养殖新品种, 人工繁育的定向选择压力对黑鲷影响还不大。

表 4 5 个群体黑鲷遗传一致度(I)和遗传距离(D)

Tab.4 The genetic similarity (I) and genetic distance (D) among the five *S. schlegelii* populations

居群	QD	RZ	RC	CD	TH
QD	—	0.001	0.002	0.022*	0.002
RZ	0.999	—	0.003	0.020*	0.002
RC	0.998	0.997	—	0.024*	0.001
CD	0.979	0.980	0.976	—	0.022*
TH	0.998	0.998	0.999	0.978	—

注: 左下角为遗传一致度(I), 右上角为遗传距离(D)。 $D^* > 0.01$

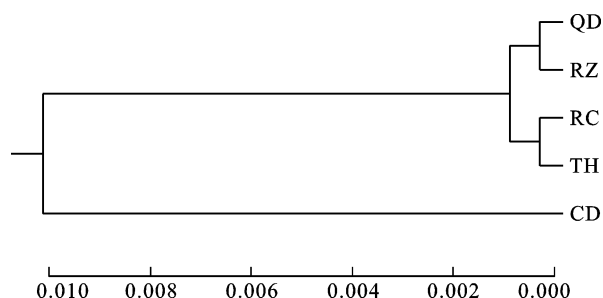


图 1 根据遗传距离构建的 5 个群体黑鲷的 UPGMA 聚类分析图

Fig.1 The dendrogram of the five *S. schlegelii*'s populations in genetic distance

所测 5 个群体中长岛群体的 XDH-2 位点缺失, 这可能是由长岛黑鲷群体和其它群体的居群差异造成的(Nevo, 1978), 也可能是因为所取 5 个群体黑鲷样品中, 长岛群体都是 3 龄鱼, 其它皆为 2 龄鱼, XDH 在黑鲷的不同生长阶段基因表达不同, 具体原因有待进一步研究。

对 5 个群体的 UPGMA 聚类分析结果显示, 5 个群体聚类先后与亲缘关系和地理位置表现出明显的正相关关系: 荣成群体和荣成 F_1 代聚为一支, 青岛群体和地理位置最近的日照群体聚为一支, 两支聚类后和地理位置最远的长岛群体聚类。另根据对中国近海水文的研究, 山东半岛北岸有一自西向东的主要海流, 绕过成山头后沿山东半岛向南流入南黄海(苏纪兰等, 2005)。本实验中除长岛样品取自渤海海峡中部的北煌城岛海域, 离该海流较远以外, 荣成、青岛、日照取样点依次分布在该海流范围内, 可能是受海流的影响, 这三个海域的黑鲷产生了广泛的基因交流(Yang, 2008)。而长岛取样点与该海流距离较远, 黑鲷是近海礁栖性鱼类, 北煌城岛附近有很多大大小小的岛屿, 环境非常适合黑鲷的生存繁殖, 黑鲷又有营半定居式生活的习性, 可能因此减少了与其它海区的基因交流, 亲缘关系较远。也由此导致长岛海域黑鲷的遗传多样性在本次取样的 4 个野生群体中最低(多态位点比例 20.8%, 实际杂合度 0.043)。

为了全面、客观地评价黑鲷的遗传变异水平, 还须进一步从 DNA 等多个水平检测黑鲷群体的遗传多样性水平, 以便为黑鲷种质资源的可持续利用提供理论依据。

参 考 文 献

- 丁少雄, 王 军, 全成干等, 2001. 野生与养殖鲷状黄姑鱼群体遗传多样性的同工酶比较. 厦门大学学报(自然科学版), 40(4): 922—926
- 王中仁, 1996. 植物等位酶分析. 北京: 科学出版社, 120—163
- 何忠效, 张树政, 1999. 电泳. 北京: 科学出版社, 11—58
- 苏纪兰, 袁业立, 2005. 中国近海水文. 北京: 海洋出版社, 170—228
- 金鑫波, 2006. 中国动物志 硬骨鱼纲鲷形目. 北京: 科学出版社, 138—142
- 高悦勉, 孙静波, 2004. 刺参种群同工酶的生化遗传分析. 大连水产学院学报, 9(1): 30—34
- 梁君荣, 王 军, 苏永全等, 2003. 斜带髯鲷养殖群体遗传多样性的同工酶研究. 台湾海峡, 22(1): 19—23
- 熊全沫, 1992a. 鱼类同工酶谱分析(上). 遗传, 14 (2): 41—44
- 熊全沫, 1992b. 鱼类同工酶谱分析(下). 遗传, 14 (3): 47—48
- Gennady P Manchenko, 2003. 华子春, 郑伟娟, 董祥柏等译, 2007. 酶的凝胶电泳检测手册. 北京: 化学工业出版社, 40—558
- Nei M, 1975. 王家玉译, 1983. 分子群体遗传学与进化论. 北京: 中国农业出版社, 121—133
- Yang J, 2008. Genetic Structure of the Veined Rapa Whelk (*Rapana venosa*) Populations Along the Coast of China. Biochem Genet, 46(9—10): 539—548
- Nevo E, 1978. Genetic variation in natural populations: pattern and theory. Theor Population Biology, 13(1): 121—177
- Nei M, 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89: 583—590
- Rice W R, 1989. Analyzing tables of statistical tests. Evolution, 43: 223—225
- Rousset F, 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. Genetics, 145: 1219—1228

ALLOZYME AND GENETIC DIVERSITY OF BLACK ROCKFISH *SEBASTES SCHTEGELI*

LIU Li-Juan^{1,2}, REN Li-Hua¹, JIANG Xiang-Yang¹, SONG Xiu-Kai¹, LIU Ai-Ying¹, DU Rong-Bin³,
ZHANG Jing^{1,4}, JIANG Hai-Bin¹

(1. Shandong Marine Fisheries Research Institute, Yantai, 264006; 2. School of Life Science, Shandong Normal University, Jinan, 250014; 3. School of Oceanology, Yantai University, Yantai, 264005; 4. School of Fishery and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306)

Abstract Allozymes of five populations of black rockfish *Sebastes schlegeli* collected from the coastal areas of Shandong Peninsula are isolated and analyzed with polyacrylamid gel electrophoresis (PAGE). 25 loci in 13 enzymes are examined. Result shows that the mean proportion of polymorphic loci (P) ranges 36.0%—20.8%, predicted heterozygosity (H_e) 0.076—0.036, and actual heterozygosity (H_o) 0.063—0.040, showing a large genetic diversity among the 5 populations with the genetic distance (D) from 0.024 to 0.001. The result of UPGMA shows that the cluster reflects a very positive correlation among populations and locations. In terms of genetic distance, Changdao population is far from other 4 populations, and reaches the level of different geographical population.

Key words Allozyme, Black Rockfish *Sebastes schlegeli*, Genetic diversity